

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02481

研究課題名（和文）分裂期紡錘体の形成・配置制御を司るダイニン複合体/クラスターの機能構造の解明

研究課題名（英文）Understanding functional structure of dynein complexes/clusters required for mitotic spindle assembly and positioning

研究代表者

清光 智美 (Kiyomitsu, Tomomi)

沖縄科学技術大学院大学・細胞分裂動態ユニット・准教授

研究者番号：10503443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、オーキシン誘導デグロン法や、生化学解析を組み合わせ、ダイニン複合体/クラスターの機能と、その制御機構の解明を目指した。まず、ダイニンアダプターのNuMAの分解表現型解析を通じて、紡錘体極の収束異常はチェックポイントに感知されずに染色体分配異常につながるという新概念を提唱した(van Toorn et al., Current Biology 2023)。他のダイニン複合体構成因子の分解表現型も、論文準備中である。またメダカ初期胚での紡錘体形成の可視化や機能解析も進め、論文を公表した(Kiyomitsu et al., Nature Communications 2024)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、ヒト細胞において紡錘体の極収束異常は、チェックポイントに感知されずに染色体の分配異常につながるという、新しい概念を提唱することができた。また本研究成果は、分裂期のダイニン複合体の機能や複合体形成、紡錘体形成、配置制御機構を理解する上で必須の知見を提供する。また脊椎動物の初期胚におけるダイニン複合体の細胞内動態や機能はこれまでほとんど解析されておらず、新たな知見となり、哺乳類を含む動物の初期胚分裂やその異常の理解に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aim to understand the functional structure and its regulations of dynein complexes/clusters during mitosis by combining auxin-inducible degron, biochemical purification, and mass spectrometry. Regarding human cell projects, we succeeded in analyzing AID-dependent depletion phenotype in dynein, dynactin or other dynein-binding partner depleted conditions. In addition, we succeeded in purifying mitotic dynein complexes and its modifications using mass spectrometry. Importantly, we found that NuMA depletion causes chromosome missegregation via checkpoint-insensitive k-fiber minus-end detachment from mitotic spindle poles (van Toorn et al., Current Biology 2023). We are additionally preparing two research papers. Regarding medaka fish project, we published a paper which characterizes spindle assembly processes in medaka early embryos (Kiyomitsu et al., Nature Communications 2024).

研究分野：細胞生物学

キーワード：紡錘体 ダイニン オーキシン誘導デグロン メダカ NuMA

1. 研究開始当初の背景

多細胞体の形成には、細胞分裂の対称性・非対称性制御による娘細胞の運命決定、組織パターン形成が重要となる。分裂の対称性・非対称性は、紡錘体配置に依存するが、ヒトの体細胞においては、細胞表層に局在する「紡錘体牽引装置」が紡錘体から伸びた星状体微小管を捕捉・牽引することで、紡錘体配置を制御すると考えられている。これまで、この分子装置には、分子モーターダイニン(Dynein)、ダイナクチン(Dynactin)、NuMAが含まれることが報告されていた。近年、私たちは光操作やゲノム編集技術を駆使して、ダイニン、ダイナクチン、NuMAの集合体(Dynein-Dynactin-NuMA (DDN) cluster と命名、以降ダイニクラスターと呼ぶ)が紡錘体牽引に十分な中枢装置である事を発見した(Okumura et al., *eLife* 2018)。しかし、この高次構造体が、どのように動的な微小管末端を捕捉し、牽引力を生み出すのか、その仕組みは十分に実証されていない。またダイニクラスターや、その機能単位であるダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体が、どのように分裂期特異的に形成され、異なる細胞内部位(紡錘体極)でどのように機能し制御されているのかも、理解されていない。さらに、発生過程に目を移すと、脊椎動物の初期胚細胞は大きいため、小さな体細胞とは異なる紡錘体形成機構や配置制御機構の存在が推定される。しかし、それらの仕組みやダイニンがどのように関与するのかは、ほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

以下の6点を具体的な目的とした。1-5ではヒトの培養細胞を用い、6ではメダカ初期胚を用いた。

1. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体による紡錘体極収束機構
2. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体の分裂期特異的形成機構
3. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体の解離機構
4. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体およびダイニクラスターの細胞内高次構造の可視化
5. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体およびダイニクラスターの試験管内再構成と構造解析
6. メダカ初期胚細胞での、ダイニンと微小管動態の解析

3. 研究の方法

1. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体による紡錘体極収束機構

ダイニン、ダイナクチン、NuMA及び、ダイニン結合因子のLis1とNde1を加えた5種類のダイニン関連遺伝子について、まずはAIDノックイン細胞株(mAID-mClover-3xFLAG)を樹立する。その後、AID依存的な分解誘導や、私たちが樹立した分裂期中期分解系(Tsuchiya et al., *Current Biology* 2021)を用い、標的因子の分解が紡錘体の極収束の形成や維持、他の因子の局在に与える影響をライブイメージングで解析する。

2. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体の分裂期特異的形成機構

まずは分裂期に安定してダイニン、ダイナクチン、NuMA を安定な複合体として免疫沈降可能なバッファー条件を最適化する。その後、間期と分裂期の細胞抽出液を調整し、ダイニンあるいはNuMA を免疫沈降後、精製し、質量分析によって、分裂期特異的な修飾や未知の結合因子がないか検討する。修飾情報が得られた場合、その変異体を作成し置換実験を行うことで、その修飾の機能を明らかにする。

3. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体の解離機構

NuMA 断片やその他の既知のダイニンアダプタータンパクを強制的に細胞膜に局在化させ、それが細胞周期依存的に細胞質のダイニンを細胞膜上に局在化させるかどうか、検討する。また CDK1, Plk1 キナーゼ等の分裂期キナーゼの阻害剤を利用し、アダプターとダイニンの相互作用を制御する標的キナーゼの候補を検討する。また候補の阻害剤が得られれば、阻害前後でダイニン複合体の修飾状態の変化を質量分析で解析し、リン酸化部位の同定と、その機能解析まで行う。一方、2.でダイニン-ダイナクチン-NuMA 複合体を精製できれば、それに脱リン酸化酵素を反応させ、脱リン酸化が複合体の乖離に必要かどうか検討する。

4. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体/クラスターの細胞内高次構造の可視化

ダイニン複合体を免疫沈降後、ゲル濾過カラムを用いて、ダイニン-ダイナクチン-NuMA を含む巨大複合体を精製、単離する。その後、ネガティブ染色により電子顕微鏡で構造を観察する。また微小管と混ぜた状態でも同様に構造を観察する。

5. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体/クラスターの試験管内再構成と構造解析

これまで精製したダイニン、ダイナクチン、NuMA をそれぞれ混ぜても、試験管内では複合体を形成できていないことが分かっている。2.3の研究により、複合体形成に必要な酵素や補因子を同定することができれば、大腸菌や昆虫細胞で発現・精製したダイニン、ダイナクチン、NuMA の部分断片、あるいは、間期の細胞抽出液と2.で得られた分裂期特異的な修飾酵素やタンパクを用いて、ダイニン-ダイナクチン-NuMA の3者複合体の試験管内再構成を行う。

6. メダカ初期胚細胞での、ダイニンと微小管動態の解析

すでに名古屋大学田中研で樹立されたEGFP-チューブリン発現システムを用いて、受精後第一細胞期から32細胞期程度までの紡錘体動態を生細胞で観察することに成功している。観察数を増やし、紡錘体配置の正確性や、細胞サイズの減少に伴う紡錘体サイズ・形の変化などを定量的に解析する。また、ゲノム編集技術を用いて、染色体を赤色蛍光で可視化できるシステムを作成し、微小管と染色体の2色同時ライブイメージングを実現する。またヒト培養細胞と同様に、ダイニン重鎖遺伝子領域やダイナクチン構成因子の遺伝子座に蛍光タンパクとAIDタグ(mAID-mClover-3xFLAG)をノックインしたシステムを作成し、その初期分裂における動態を詳細に生細胞で解析する。また初期胚でのオーキシン誘導デグロンの条件検討も進める。

4. 研究成果

1. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体による紡錘体極収束機構

ダイニン重鎖(DHC)、ダイナクチン(p50サブユニット)、NuMA及び、ダイニン結合因子のLis1とNde1を加えた5種類のダイニン関連遺伝子について、HCT116細胞を用いて、それぞれホモのAIDノックイン細胞株(mAID-mClover-3xFLAG)を樹立した。またそれぞれの細胞株で、DHC, p50, NuMA, LIS1等の局在を観察するためにSNAPタグをノックインした株も作成した。その後、私たちが樹立した分裂期中期分解系(Tsuchiya et al., *Current Biology* 2021)を用い、標的因子を分裂期中期に分解誘導し、紡錘体の極収束表現型と、他の因子の局在に与える影響をライブイメージングで解析した。するとDHC, p50, LIS1を分解すると、紡錘体の極収束が維持できないことが分かった。またその際に、それぞれの紡錘体極局在は減少した。Nde1は紡錘体極には集積しなかったが、分解するとLIS1の紡錘体極局在が低下し、同様の極収束欠損が観察された。一方、NuMAを分解誘導すると、NuMAの蛍光は顕著に減少するにも関わらず、ダイニン等の極局在は比例して減少せずに、紡錘体の極収束も維持された。ただし、時間が経つにつれ、極収束の異常も散見された。またダイニンとNuMAは非依存的に紡錘体極に局在できることも確認した。以上の結果から、紡錘体極においては、少なくとも一部のダイニンはNuMAと結合せずに紡錘体極の維持に機能していることが示唆された。現在論文準備中である。

またNuMAに関しては、分解によって誘導される整列異常染色体の動態について詳細に解析した。特に、動原体Mis12とチェックポイントタンパクMad2, BubR1を同時可視化し、極収束欠損により誘発された不整列染色体は、分裂期チェックポイントに感知されず後期に進行するため染色体分配異常につながるという、染色体分配異常の新たな概念を示した。またガン細胞株のみならず、正常不死化細胞株Rpe1でも同様の現象が起こることを見出し、論文に報告した(van Toorn et al., 2023 *Current Biology*)。

2. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体の分裂期特異的的形成機構

分裂期に安定してダイニン、ダイナクチン、NuMAを安定な複合体として免疫沈降可能なバッファー条件を最適化することに成功した。その後、間期と分裂期の細胞抽出液を調整し、ダイニンあるいはNuMAを免疫沈降後、精製し、質量分析によって、分裂期特異的な修飾や結合因子の同定にも成功した。ダイニンとの相互作用部位と考えられるNuMAのN末端側のリン酸化部位にアラニン変異を導入し、それらがダイニンの膜局在化に影響を与えることも確認した。現在、さらに複数の変異を導入した際によりダイニンの膜局在化能が下がるか検討している。今後は、それらの変異を導入したNuMAの全長変異体を作成し、レスキュー実験による表現型解析を行う予定である。

3. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体の解離機構

NuMA断片やその他の既知のダイニンアダプタータンパクを強制的に細胞膜に局在化させ、それが細胞周期依存的に細胞質のダイニンを細胞膜上に局在化させるかどうか、検討し、NuMAはまさに分裂期特異的にダイニンと結合する性質があることを明らかにした。またNuMAのダイニン局在化能は、CDK1, Plk1キナーゼの阻害剤処理により減少することから、ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体の形成は、CDK1, Plk1により正に制御されることが示唆された。一方、2.で得られたダイニン

-ダイナクチン-NuMA複合体に脱リン酸化酵素を反応させると、ダイニン-ダイナクチンはNuMAから乖離することが分かった。これらの結果から、ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体形成、乖離にはリン酸化制御が関与すると考えられた。

4. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体/クラスターの細胞内高次構造の可視化

ダイニン複合体を免疫沈降するところまで成功した。その後、ゲル濾過カラムを用いて、ダイニン-ダイナクチン-NuMAを含む巨大複合体の精製、単離には現在取り組んでいる最中であり、もし精製できれば、ネガティブ染色後に電子顕微鏡で観察する予定である。

5. ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体/クラスターの試験管内再構成と構造解析

このテーマについては、現時点で実験ができなかったが、今後間期の細胞抽出液を回収し、それに精製したCDK1/cyclin複合体とPlk1キナーゼを混ぜることで、ダイニン-ダイナクチン-NuMA複合体ができるか、検討する予定である。

6. メダカ初期胚細胞での、ダイニンと微小管動態の解析

ゲノム編集技術を用いて、染色体結合のRCC1を赤色蛍光(mCherry)で可視化できるシステムを作成し、微小管(EGFP-a-tubulin)と染色体(RCC1-mCherry)の2色同時ライブイメージングを実現した。受精後第一細胞期から胞胚期(受精後10時間程度)までの紡錘体動態を生細胞で観察し、細胞サイズの減少に伴う紡錘体サイズ・形の変化などを定量的に解析した。特に、初期胚(1細胞期から256細胞期ごろ)までには、紡錘体の中央に微小管の密度の濃い領域が存在することを発見し、その領域は分裂期中期に形成されることも見出した。またRCC1のAID依存的分解にも成功し、その微小管密度の濃い紡錘体の中央領域はRCC1依存的に形成されることも見出した。RCC1の分解はその後、ラギング染色体やchromosome bridge, 不分離表現型など、異常な染色体分配を示したことから、RCC1によって生成されるRan-GTPシグナルが初期胚紡錘体の形成と染色体分配に必須であることが示唆された。また胞胚期にRCC1を分解誘導しても、初期胚で見られたような異常な染色体分配異常は見られなかったことから、Ran-GTPシグナルの機能必須性は発生段階により変化することも示唆された。以上の成果はNature Communications誌に報告した。

またダイニン重鎖、ダイナクチンp50遺伝子座にmAID-mClover-3xFLAGをノックインしたメダカ系統の樹立にも成功し、それぞれの細胞内局在動態や分解表現型の解析にも成功した。現在、論文準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kiyomitsu Ai, Nishimura Toshiya, Hwang Shiang Jyi, Ansai Satoshi, Kanemaki Masato T., Tanaka Minoru, Kiyomitsu Tomomi	4. 巻 15
2. 論文標題 Ran-GTP assembles a specialized spindle structure for accurate chromosome segregation in medaka early embryos	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-45251-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 van Toorn Marvin, Gooch Amy, Boerner Susan, Kiyomitsu Tomomi	4. 巻 33
2. 論文標題 NuMA deficiency causes micronuclei via checkpoint-insensitive k-fiber minus-end detachment from mitotic spindle poles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 572 ~ 580.e2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2022.12.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tomomi Kiyomitsu
2. 発表標題 How does universal chromosome segregation machinery adapt to specialized cleavage divisions in vertebrate embryos?
3. 学会等名 The 45th annual meeting of Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomomi Kiyomitsu
2. 発表標題 How dynein-NuMA complexes maintain mitotic spindle-pole focusing in human cells.
3. 学会等名 The 44th annual meeting of Molecular Biology Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomomi Kiyomitsu
2. 発表標題 Mechanisms of spindle assembly and maintenance in somatic cells and medaka fish embryos
3. 学会等名 The 49th Naito Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomomi Kiyomitsu
2. 発表標題 Ran-GTP promotes zygotic spindle assembly in Medaka Oryzias latipes
3. 学会等名 Mitotic Spindle: From living and synthetic systems to theory (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomomi Kiyomitsu
2. 発表標題 Mechanisms of spindle assembly in medaka fish embryos
3. 学会等名 Cell Bio23 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------